

PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

zveřejněná podle § 31 zákona č. 527/1990 Sb.

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **12.03.2001**
(32) Datum podání prioritní přihlášky: **13.03.2000**
(31) Číslo prioritní přihlášky: **2000/RM000128**
(33) Země priority: **IT**
(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **12.03.2003**
(Věstník č. 3/2003)
(86) PCT číslo: **PCT/IT01/00120**
(87) PCT číslo zveřejnění: **WO01/068071**

(21) Číslo dokumentu:

2002 - 2761

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl. ⁷:

A 61 K 31/473 A 61 P 35/04
A 61 K 31/352
A 61 P 9/14
A 61 P 9/10
A 61 P 17/06
A 61 P 19/02
A 61 P 27/02
A 61 P 35/00

(71) Přihlašovatel:

SIGMA-TAU INDUSTRIE FARMACEUTICHE
RIUNITE S. P. A., Roma, IT;

(72) Původce:

Penco Sergio, Milan, IT;

(74) Zástupce:

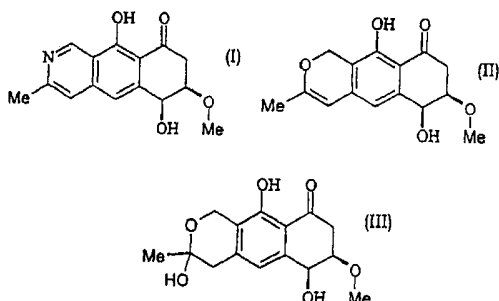
Vandělíková Jana Ing., Petráská 12, Praha 1, 11000;

(54) Název přihlášky vynálezu:

**Použití přírodních látek s antiangienními
účinky**

(57) Anotace:

Použití řady sloučenin přirozeného původu jakožto látek k léčbě onemocnění charakterizovaných abnormální angiogenezí. Jsou to tyto sloučeniny: chrysanthon A obecného vzorce I, chrysanthon B obecného vzorce II a chrysanthon C obecného vzorce III.



Použití přírodních látek s antiangiogenními účinky

Oblast techniky

Zde popisovaný vynález se týká použití sloučenin přírodního původu k léčbě onemocnění spojených s abnormální angiogenezí.

Dosavadní stav techniky

Angiogeneze u dospělých lidí normálně neprobíhá, avšak je normální funkcí například při hojení otevřených ran, nebo při obnově slizniční vrstvy dělohy během reprodukčního cyklu ženy.

Pokud jsou omezeny vaskulární funkce a prokrvení tkáně je neodpovídající, je angiogenní odezva stimulována fyziologicky.

Obecněji řečeno uplatňuje se to za fyziologických podmínek, kdy angiogeneze vytváří kladnou zpětnou vazbu jakožto odezvu na neodpovídající prokrvení, nebo na omezený přísun kyslíku a živin, což například nastává v případě okluze arterie při růstu tkáňové hmoty (například při neovaskularizaci, která provází tvorbu svalové hmoty), a v případě zvýšené pracovní zátěže spojené se zvýšenými požadavky na kyslík a živiny.

Během lokální ischemie je vlivem částečné nebo úplné okluze arterie nezbytný vývoj kolaterálních cest, aby byl zachován oběh.

Normální proces angiogeneze je regulován rovnováhou mezi proangiogenními látkami jako je růstový faktor fibroblastů (FGF), placentární růstový faktor, růstový faktor vaskulárního endotelu

(VEGF), transformační růstový faktor (TGF), angiogeninem, interleukinem-6 a hepatocytickým růstovým faktorem a negativními angiogenními regulátory jako je thrombospondin-1, angiostatin, alfa interferon, fragment prolaktinu 16-Kd, inhibitory metalloproteináz (MMPS), faktor 4 krevních destiček a genistein.

Je dobře známo, že růst primárního nádoru je podporován dobrou vaskularizací nádorové tkáně. Odpovídající přísun kyslíku a živin podporuje rychlý růst samotného nádoru.

Bylo prokázáno, že nadměrná angiogeneze může být v prognóze neoplasmů neobyčejně negativním faktorem (van Hinsbergh, V. W., Collen, A., Koolwijk, P., Ann. Oncol., 10. dodatek, 4, 60 - 63, 1999; Buolamwini, J. K., Curr., Opin., Chem., Biol., 3, (4), 500 – 509, srpen 1999).

V neoplasmatickém oboru je též známo, že základním předpokladem pro biologii nádorové buňky je zajištění metastázovací schopnosti.

Nádorové buňky, které metastázuje, ztrácejí přilnavost k okolním strukturám, napadají krev a lymfatické cesty a kolonizují další vzdálené tkáně, kde pokračují ve vlastní reprodukci.

Metastáze jsou také kritickou příhodou v klinické historii onemocnění, a jsou hlavní příčinou smrti v důsledku rakoviny. Jsou těsně spjaty s přítomností vaskulárních tkání v místě nádoru a přilehlých oblastech a napomáhají jim.

Migrace nádorových buněk napříč okolními strukturami umožňuje buňkám dosáhnout krevních cest uvnitř nádoru, a to ať už dříve existujících, či vytvářených neoangiogenezí, čímž dosahují krevního řečiště (Ray, J. M., Stetler-Stevenson, W. G., Eur. Respir. J., 7, (11), 2062 – 2072, 1994; Stetler-Stevenson, W. G., Liotta, L. A., Kleiner, D. E. Jr., FASEB J., 7, (15), 1434 – 1441, prosinec 1993).

Existence komunikace mezi lymfatickými a krevními cestami ve vaskulární oblasti nádoru, umožňuje neoplastickým buňkám pohyb v obou vaskulárních systémech.

Poslední studie ukázaly přímý vztah mezi angiogenezí a arthritickým onemocněním (Koch, A. E., Arthritis and Rheumatism, 41, 951 – 962, 1998). Zvláště bylo prokázáno, že při vytváření pannu a při postupu arthritidy hraje klíčovou úlohu neovaskularizace artikulárních chrupavek. Normální chrupavka nemá krevní cesty, zatímco synoviální tekutina arthritických pacientů obsahuje faktor stimulující angiogenezi vytvářený endotheliálními buňkami (EASF).

Přítomnost faktoru je spojena s vaskularizací a degradací chrupavky.

I jiných onemocnění se také abnormální angiogeneze týká.

Bylo zjištěno, že u diabetické retinopatie (Histol Hisopathol., 14, (4), 1287 – 1294, říjen 1999), psoriazy (Br. J. Dermatol, 141, (6), 1054 – 1060, prosinec 1999), chronického zánětu a aterosklerozy (Planta Med., 64, (8), 686 – 695, prosinec 1998) je napomáhajícím faktorem neovaskularizace napadených tkání.

Regulace neovaskularizace je tedy u těchto onemocnění jedním ze základních regulačních a léčebných prvků.

Již jsou známy látky přirozeného původu s antiangiogením působením, vhodné k humánní terapii.

Například fumagillin – sloučenina extrahovaná z houby *Aspergillus fumigatus* vykazuje významnou antiangiogenní schopnost. Její syntetický derivát TNP-470 je ve stavu klinických zkoušek při léčbě nádorů (Griffith, E. C., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 95, (26), 15163 – 15168, 1998).

Combrestatin – účinná složka extrahovaná z kůry africké vrby, je silným inhibitorem neovaskularizace a působí přímo a selektivně na nově vytvořený endothel krevního řečiště (Cancer Research, 57, 1829, 1997). Tato sloučenina byla nedávno zařazena do fáze I klinických zkoušek a později do fáze II jako inhibitor angiogeneze.

Kurkuminy, které jsou fenolickými sloučeninami izolovanými z rostliny *Curcuma longa*, inhibují angiogenezi přímým působením na endotheliální morfogenezi modulující aktivitu mnoha proteás (Cell Growth Diff., 9, (4), 305 – 312, 1998).

Aldehyd skořicový – sloučenina izolovaná z kůry *Cinnamomum cassia* Blume - vykazovala výrazné antiangiogenní vlastnosti, větší než další sloučeniny s podobným působením nacházející se v přírodě, jako je například genistein (Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters, 7, (19), 2473 – 2476, 1997).

Přes pokroky učiněné v posledních letech je tato oblast farmakologického výzkumu považována mnoha odborníky v oboru medicíny za jednu z nejslibnějších oblastí pro objevování nových léčiv k léčbě onemocnění charakterizovaných abnormální angiogenezí a zvláště nádorů.

U těchto onemocnění stále ještě přetrvává značná potřeba nalézání nových sloučenin schopných blokovat mechanismus abnormální angiogeneze, který je zodpovědný za taková onemocnění, nebo s ním interferovat, a tak nalézt způsob jejich léčby.

Jak již bylo zmíněno, mezi taková onemocnění patří arthritická onemocnění, nádory, diabetická retinopatie, psoriáza, chronické záněty a ateroskleróza.

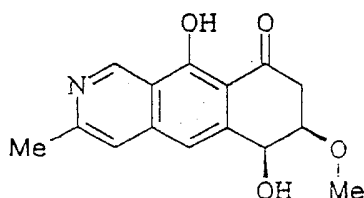
O jednom z vyskytujících se přirozených produktů houbového původu - chrysanthonu A – metabolitu izolovaného Nasinim, et al. z houby *Ascochyta chrysanthemi* (*Phytochemistry*, 29, 923, 1989) bylo zjištěno, že má bakteriostatické a fungicidní účinky. Další studie na tomto kmeni hub umožnily izolaci dvou dalších sloučenin podobných chrysanthonu A – přesněji chrysanthon B a chrysanthon C, izolovaný Nasinim, et al. (*Phytochemistry*, 29, (8), 2499 – 2502, 1990).

Podstata vynálezu

Nyní bylo zjištěno, že chrysanthon A, chrysanthon B a chrysanthon C mají antiangiogenní účinky a jsou tedy vhodnými látkami k léčbě onemocnění charakterizovaných abnormální angiogenezí.

Sloučeniny podle vynálezu zde popisovaného jsou:

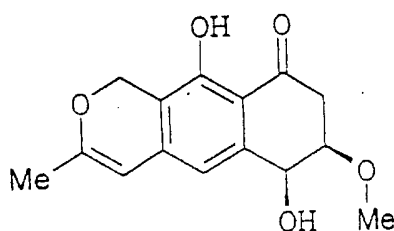
chrysanthon A obecného vzorce (I)



(I)

popsaný ve Phytochemistry, 29, 923, 1989;

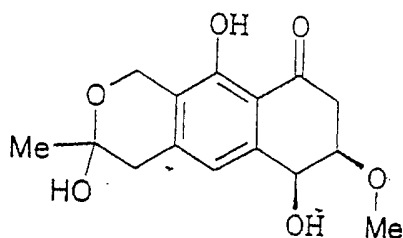
chrysanthon B obecného vzorce (II)



(II)

popsaný ve Phytochemistry (29, (8), 2499 – 2502, 1990); a

chrysanthon C obecného vzorce (III)



(III)

popsaný ve Phytochemistry (29, (8), 2499 – 2502, 1990).

Sloučeniny podle vynálezu ukázaly, že mají angiogenní účinky a mohou být tedy vhodnými látkami k léčbě onemocnění charakterizovaných abnormální angiogenezí.

Jedním z předmětů zde popisovaného vynálezu je použití chrysanthonu A nebo chrysanthonu B nebo chrysanthonu C k přípravě léčiva s antiangiogenními účinky.

Dalším předmětem zde popisovaného vynálezu je použití chrysanthonu A nebo chrysanthonu B nebo chrysanthonu C k léčbě onemocnění nádorového typu.

Dalším předmětem zde popisovaného vynálezu je použití chrysanthonu A nebo chrysanthonu B nebo chrysanthonu C k prevenci a omezení nádorových metastáz.

Dalším předmětem zde popisovaného vynálezu je použití chrysanthonu A nebo chrysanthonu B nebo chrysanthonu C k léčbě arthritických onemocnění.

Dalším předmětem zde popisovaného vynálezu je použití chrysanthonu A nebo chrysanthonu B nebo chrysanthonu C k léčbě diabetické retinopatie.

Dalším předmětem zde popisovaného vynálezu je použití chrysanthonu A nebo chrysanthonu B nebo chrysanthonu C k léčbě psoriazy.

Dalším předmětem zde popisovaného vynálezu je použití chrysanthonu A nebo chrysanthonu B nebo chrysanthonu C k léčbě chronických zánětlivých onemocnění.

Dalším předmětem zde popisovaného vynálezu je použití chrysanthonu A nebo chrysanthonu B nebo chrysanthonu C k léčbě atherosklerozy.

Sloučeniny podle vynálezu se mohou získat podle popisu ve *Phytochemistry*, 29, 923, 1989 a *Phytochemistry*, 29, (8), 2499 - 2502, 1990).

Dále je uvedeno několik pokusných hodnot ilustrujících vynález.

Příklad 1

Zkoušky účinků chrysanthonu A

Farmakologické účinky této sloučeniny byly hodnoceny předpovědními biologickými zkouškami, které napodobují hlavní angiogenní mechanismus *in vitro*. Tyto zkoušky se obvykle používají k hodnocení proangiogenních nebo antiangiogenních účinků zkoušených sloučenin.

Zkoušky toxicity

Hodnocení reálné toxicity chrysanthonu A bylo prováděno jeho porovnáváním se suraminem s použitím zkoušky cytotoxicity se sulforhodaminem B (SRB) popsané dále.

Bovinní mikrovaskulární endoteliální buňky (BMEC) v kultivačním mediu (200 μ l na jamku) byly naočkovány na 96 jamkové mikrotitrační destičky v koncentraci 3000 buněk na jednu jamku. Další den byla do jamek přidána různá vzestupná množství studovaných sloučenin. Třetí den po naočkování bylo medium odstraněno a provedeno trojí promytí roztokem PBS. Na konci promývání bylo do každé jamky přidáno 200 μ l kultivačního media a

plotny umístěny do inkubátoru při 37 °C s 5 % atmosférou CO₂ na dobu dalších 48 hodin. Na konci této inkubační doby se medium odstranilo a na buňky se za studena působilo 15 % roztokem kyseliny trichloroctové (TCA) po dobu 1 hodiny. Jamky byly třikrát promyty ponořením plotny do destilované vody a jejím odstraněním převrácením. Na plotny bylo přidáno 200 µl na jamku 0,4 % SRB v 1 % kyselině octové a inkubováno po dobu 30 minut. Jamky byly třikrát promyty 1 % kyselinou octovou a nakonec přidáno 200 µl 10 mM Tris na jamku.

Obarvené jamky byly vyhodnoceny spektrofotometricky při vlnové délce 540 nm. Porovnáním hodnot získaných z jamek obsahujících studovanou sloučeninu a kontrolních bylo možno stanovit hodnoty IC₅₀ a IC₀ studovaných sloučenin podle vynálezu, definované jako koncentrace odpovídající 50 % cytotoxickému účinku (IC₅₀) a maximální necytotoxické koncentraci (IC₀).

Výsledky získané a uvedené v tabulce 1 ukazují, že chrysanthon A má hodnotu IC₅₀ na BMEC 1,5 µM.

Zkouška chemotaxicity

Tato zkouška je prvním přehledným hodnocením sloučenin s potenciální antiangiogenní inhibicí nebo podpůrným účinkem (Glaser, B. M., et al., Nature, 288, 483 – 484, 1980).

Chrysanthon A – jedna ze sloučenin, kterých se vynález týká, byla podrobena chemotaxické zkoušce za použití Boydenovy komůrky (Werner, F., Goodwin, R. H. a Leonard, E. J., Journal of Immunology Methods, 33, 239 – 247, 1980).

Realizace tohoto hodnocení in vitro vyžadovala vyvinutí technik izolace a kultivace bovinních endotheliálních buněk jak z aorty (BAEC), tak z kůry nadledvinek (BMEC), rovněž tak jako určení vhodné referenční sloučeniny. Jednou z výhod použití Boydenovy komůrky na zkoušku chemotaxie je možnost získání kvantitativních hodnot. Boydenova komůrka sestává z horní a dolní jamky, které jsou od sebe odděleny polykarbonátovým filtrem s póry 8 μm . Roztok obsahující chemoatraktant se umístí do dolní jamky a buňky se vloží do horní jamky. Po inkubaci se na spodní straně membrány spočítají buňky, které prošly filtrem, jako odezva na chemotaktický stimul.

V chemotaxické zkoušce bylo vybraným chemoatraktantem boviní sérum (1 % v kultivačním mediu DMEM). Endotheliální buňky BMEC byly resuspendovány v DMEM s 1 % albuminu z boviního séra (BSA) a sledovány po dobu 4 hodin. Chemotaxie byla kvantifikována přímým odečítáním buněk pod optickým mikroskopem. Procento migrace zjištěné na chemotaxické tabulce vyjádřené jako „% migrace“ bylo počítáno podle vzorce:

$$(T - C/C) \times 100$$

kde T = střední počet (n^0) migrujících buněk ve zkoušeném vzorku a
C = střední počet migrujících buněk v kontrolním vzorku.

Kontrola spočívající na buňkách, u kterých nebylo použito zkoumaných sloučenin migrujících proti séru byla provedena u každého chemotaxického pokusu.

Střední počet migrujících buněk je vyjádřen jako odečet 5 mikroskopických polí v jedné jamce u 4 na sobě nezávislých chemotaxických jamek pro jeden vzorek.

U chemotaxických zkoušek se běžně jako referenční látky používá suraminu.

Získané výsledky jsou uvedeny v tabulce 1 a ukazují, že ve dvou nezávislých pokusech používajících 0,4 μM chrysanthon A odpovídající IC_0 , byla inhibice migrace BMEC $44 \% \pm 0,7$ a $52 \% \pm 2,8$.

Tabulka 1

látky	cytotoxicita na BMEC		% migrace IC_0
	IC_{50}	IC_0	
suramin (referenční)	>500 μM	100 μM	100 μM = -58
chrysanthon A	1,5 μM	0,4 μM	0,4 μM = -44/-52

Příklad 2

Zkoušky účinků chrysanthonu C

Zkouška toxicity

Tato zkouška byla provedena s použitím postupu popsaného v příkladu 1.

Získané výsledky uvedené v tabulce 2 ukazují, že chrysanthon C má IC_{50} na BMEC 35 μM .

Zkouška chemotaxicity

Tato zkouška byla provedena s použitím postupu popsaneho v příkladu 1.

Získané výsledky uvedené v tabulce 2 ukazují, že při použití 10 μM chrysanthonu C odpovídající jeho IC_0 způsobí inhibici migrace BMEC $54 \% \pm 7,6$.

Tabulka 2

látka	cytotoxicita na BMEC		% migrace IC_0
	IC_{50}	IC_0	
suramin (referenční)	>500 μM	100 μM	100 μM = -58
chrysanthon C	35 μM	10 μM	10 μM = -52

Příklad 3

Zkouška cytotoxicity chrysanthonu A na humánní nádorové linie

Tato zkouška byla provedena s použitím postupu popsaneho v příkladu 1.

Zkoušeny byly následující 4 humánní nádorové linie: MCF-7; Mes-Sa; LoVo; a LoVo-Dx.

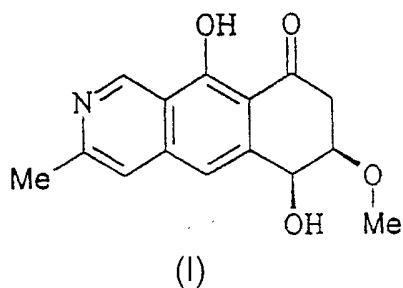
Získané výsledky uvedené v tabulce 3 ukazují, že chrysanthon A má na zkoušené nádorové linie přímý cytotoxický účinek.

Tabulka 3

	IC ₅₀ linie MCF-7	IC ₅₀ linie Mes-Sa	IC ₅₀ linie LoVo	IC ₅₀ linie LoVo-Dx
chrysanthon A	11,6 ± 0,7 µM	7,8 ± 0,2 µM	15,8 ± 0,4 µM	80 ± 4 µM

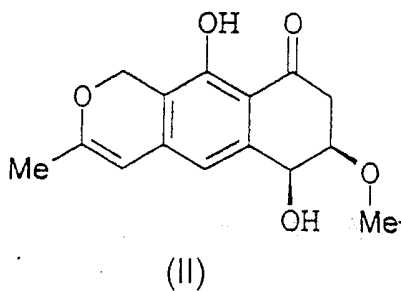
Patentové nároky

1. Použití chrysanthonu A obecného vzorce (I)



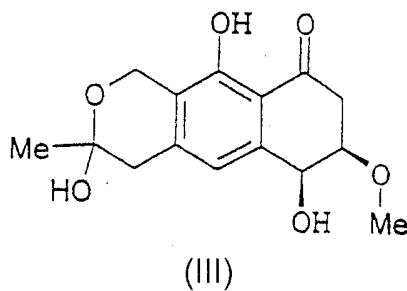
k přípravě léčiva s antiangiogenním účinkem.

2. Použití chrysanthonu B obecného vzorce (II)



k přípravě léčiva s antiangiogenním účinkem.

3. Použití chrysanthonu C obecného vzorce (III)



k přípravě léčiva s antiangiogenním účinkem.

4. Použití podle nároku 1, 2 a 3 k léčbě onemocnění nádorového typu.

5. Použití podle nároků 1, 2 nebo 3 k prevenci a léčbě nádorových metastáz.
6. Použití podle nároků 1, 2 nebo 3 k léčbě arthritických onemocnění.
7. Použití podle nároku 1, 2 a 3 k léčbě diabetické retinopatie.
8. Použití podle nároků 1, 2 nebo 3 k léčbě psoriázy.
9. Použití podle nároků 1, 2 nebo 3 k léčbě chronických zánětlivých onemocnění.
10. Použití podle nároků 1, 2 nebo 3 k léčbě aterosklerozy.